

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Takayoshi Hirose residing at Takahashi Bldg. Kita-sangokan, 13-3, Nishitenma 5-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-0047 Japan, hereby declare that:

1. I read and understand the Japanese and English languages.
2. I translated the International application PCT/JP99/04249 from Japanese into English.
3. The annexed document is, to the best of my knowledge and belief, an accurate translation of the International application PCT/JP99/04249.

This 29th day of January, 2001

Osaka, Japan

Takayoshi Hirose

Takayoshi Hirose

THIS PAGE BLANK (USPTO)

日本国特許庁

20 09 99

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 01 OCT 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 1月13日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第006261号

出願人

Applicant(s):

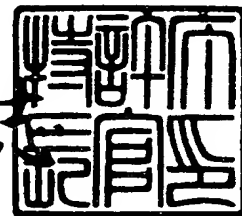
住友製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山佐平



出証番号 出証特平11-3058394

【書類名】 特許願

【整理番号】 132557

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/18

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 永野 智一

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台 3 丁目 1 1 番地 住友製薬株式会社内

 【氏名】 森 育枝

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 河村 敬夫

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 泰地 睦夫

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台 3 丁目 1 1 番地 住友製薬株式会社内

 【氏名】 野口 浩

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 谷 俊輔

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市蔵垣内1丁目3番45号 住友製薬株式会社
社内

【氏名】 前田 弘雄

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100107629

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 敏夫

【電話番号】 06-6466-5214

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第222170号

【出願日】 平成10年 8月 5日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 肝実質細胞増殖因子投与用製剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分とし、投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量の該因子を移行・分布・作用させ、且つ、投与部位以外の血液中及び全身の組織への移行・分布・作用を低減できる製剤。

【請求項 2】 虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するための、請求項 1 記載の製剤。

【請求項 3】 投与部位が筋肉である、請求項 1 又は 2 記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項 4】 投与部位が皮下又は表皮である、請求項 1 又は 2 記載の皮下投与用製剤、外用剤又はハップ剤。

【請求項 5】 投与部位が骨格筋又は心筋である、請求項 3 記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項 6】 投与部位である筋肉組織への移行・分布・作用が、血液、肝臓及び腎臓への移行・分布・作用を凌駕することを特徴とする、請求項 1、2、3 又は 5 記載の製剤。

【請求項 7】 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へボラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓における最大濃度が 100 分の 1 以下であり、投与部位である筋肉組織内濃度が 50 倍以上であることを特徴とする、請求項 1、2、3、5 又は 6 記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項 8】 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へボラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓における AUC が 5 分の 1 以下であり、投与部位である筋肉組織内 AUC が 50 倍以上であることを特徴とする、請求項 1、2、3、5 又は 6 記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項 9】 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための、請求項 1、2、3、5、6、7 又は 8 記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項 10】 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための投与部位が患部及びその周辺の筋肉局所である、請求項 9 記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項 11】 1 回の投与量が $0.01 \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ であることを特徴とする、請求項 1、2、3、5、6、7、8、9 又は 10 記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項 12】 1 回の投与量が $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ であることを特徴とする、請求項 11 記載の筋肉内投与用製剤。

【請求項 13】 動脈疾患が閉塞性動脈硬化症である、請求項 1～12 いずれか記載の製剤。

【請求項 14】 虚血性疾患が虚血性心疾患である、請求項 1～12 いずれか記載の製剤。

【請求項 15】 肝実質細胞増殖因子 (HGF) を有効成分として含有し、且つ、HGF を結合・吸着する物質を含有しないことを特徴とする、請求項 1～14 いずれか記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、肝実質細胞増殖因子 (HGF) を有効成分として含有し、虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するための投与用製剤に関する。さらに詳しくは、心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するために、患部及びその周辺の筋肉局所部位に投与することからなる筋肉内投与用製剤などに関する。

【0002】

【従来の技術】

肝実質細胞増殖因子 (HGF) は成熟肝細胞に対する強力な増殖促進因子として発見され、その遺伝子クローニングがなされたタンパク質である (Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450 (1984)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6489, (198

6)、F E B S L e t t e r, 22, 231 (1987)、N a t u r e, 342, 440 (1989)、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, 87, 3200 (1991))。その後の研究により、H G Fは*in vivo*において肝再生因子として障害肝の修復再生に働くだけでなく、血管新生作用を有し、虚血性疾患や動脈疾患の治療または予防に大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた (S y m p. S o c. E x p. B i o l., 47 c e l l b e h a v i o r, 227-234 (1993)、P r o c. N a t l. A c a d. S c i., 90, 1937-1941 (1993)、C i r c u l a t i o n, 97, 381-390 (1998))。すなわち、ウサギの下肢虚血モデルにおいてH G Fを投与すると、顕著な血管新生が見られ血流量の改善、血圧減少の抑制、虚血症状の改善が生じたとの報告がなされている。これらの報告により、今日では、血管新生因子の一つとしてH G Fが発現、機能していると考えられるようになった。

【0003】

このようにH G Fは血管新生因子の機能を始めとして種々の機能を持っており、医薬品として活用するための色々な試みがなされてきた。しかし、ここで問題となってきたのがH G Fの血中での半減期である。H G Fの半減期は約10分と短く、血中濃度を維持することが困難であり、また、H G F有効量の患部への移行性が問題となった。

【0004】

一般的にタンパク性製剤の場合は静脈内への投与の多いことが常識となっており、前記虚血性疾患モデルに対するH G Fの投与に関しても、例えば静脈や動脈内への投与の例が示されている (C i r c u l a t i o n, 97, 381-390 (1998))。このような動物モデルに対する静脈あるいは動脈内投与により、虚血性疾患あるいは動脈疾患に対するH G Fの有効性が明らかにされているものの、具体的なH G Fの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。特にH G Fの場合は、前記のような半減期の問題、患部への移行性の問題もあり、H G Fの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。

【0 0 0 5】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、HGFを有効成分として含有し、虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための投与用製剤を提供することを目的とする。さらに詳しくは、心臓又は四肢の虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するために、患部及びその周辺の筋肉局所部位に投与することからなる筋肉内投与用製剤などに関する。本発明の筋肉内投与用製剤は、例えば障害部位である心臓、四肢の虚血部位の筋肉内に直接投与されるものであり、投与されたHGFの利用効率が極めて高く、静脈内投与と比較して投与量が低減できる。さらに、投与部位である筋肉から、血液中、投与部位の筋肉組織及びその周辺の組織を除いた全身への移行、分布、作用が少ないため、副作用を軽減でき、より安全性の高いものであるという効果を有する。

【0 0 0 6】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはHGFを虚血性疾患あるいは動脈疾患に適応するにあたり、投与量、投与法の検討を鋭意行ってきた。上記疾患に対するHGFの投与法として、静脈内ボラス投与、静脈内持続投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与などの方法を想定して検討を行ってきた。

【0 0 0 7】

前記したように、一般的にタンパク性製剤の場合は静脈内投与の多いことが常識となっており、加えて、虚血性疾患及び動脈疾患は血管傷害であることから、血管の内側から薬剤を効かせるのが効果的であるとの常識があった。それゆえ、虚血性疾患モデルや動脈疾患モデルに対するHGFの投与についても、静脈あるいは動脈内への投与の例がほとんどであり、HGFの筋肉内への投与については文献も含めて情報が無く、またHGFの体内動態についても報告を見出すことができなかった。このように、虚血性疾患モデルや動脈疾患モデルに対してHGFの筋肉内投与を試みた報告はなされておらず、従ってHGFの筋肉内投与が有効であるか否かについては、今まで全く明らかにされていなかった。

【0 0 0 8】

本発明者らはラットを用いて、下肢虚血部位に対する筋肉内投与の体内動態と、他の投与経路（静脈内投与）の体内動態とを比較検討した。その結果、筋肉内投与の場合には、静脈内投与した場合と比較し、投与したHGFが投与部位で非常に高い濃度で維持され、血清中及び肝臓や腎臓への移行の低いことが明らかとなった。また、HGFを皮下投与した場合にも、筋肉内投与と同様に投与部位でのHGF濃度が高く維持され、投与部位から循環血中への移行率は低いものであった。

一方、HGFを静脈内投与した場合には、血中のHGF濃度が高く維持されるのに対して、筋肉内におけるHGF濃度は極端に低いことが見出された。このことから、虚血患部及びその周辺の筋肉又はそこに存在する血管にHGFを作用させようとした場合には、静脈内投与では効率が悪く、患部もしくはその周辺の筋肉内に直接投与することが有効であることを、初めて明らかにした。

【0009】

また、HGFの筋肉内投与と静脈内ボラス投与とを比較したところ、筋肉内投与では、血液、肝臓及び腎臓における最大濃度が静脈内ボラス投与の場合の100分の1以下、より好適には1000分の1以下となることを見出した。さらに、筋肉内投与では、投与部位の筋肉組織内濃度が静脈内ボラス投与の場合の50倍以上、より好適には200倍以上となることを見出された。

さらに、血液、肝臓及び腎臓におけるAUCを筋肉内投与と静脈内ボラス投与とで比較したところ、筋肉内投与では、血液、肝臓及び腎臓におけるAUCが静脈内ボラス投与の5分の1以下、より好適には10分の1以下となることを見出した。さらに、投与部位の筋肉組織内AUCは、筋肉内投与では、静脈内ボラス投与の50倍以上、より好適には200倍以上となることを見出された。

【0010】

以上のように筋肉内投与により、患部の投与部位にHGFが高濃度で維持されることが分かったため、次に、筋肉組織内のHGFが患部の組織や血管に移行して、HGFとしての作用を本当に果たしているか否かを調べた。すなわち、HGFのリセプターであるc-Metのリン酸化が見られるか否かを指標としてHGFの機能を確認した。その結果、30～3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のHGFをラット筋

肉内に投与した場合、筋肉組織ではHGFの受容体であるc-MetのTyr残基がリン酸化を受け、活性化されていたが、肝臓や腎臓組織では、無処置群と比し、c-Metは全く活性化されていないことが明らかとなった。このことは、投与した筋肉組織においてHGFはその作用を発揮し、肝臓や腎臓においては作用を示さないことを意味している。

【0011】

以上のようにHGFの作用が確認されたため、本発明者らは実際にHGFの筋肉内投与による有効性を調べるために、閉塞性動脈硬化症（ASO）の動物モデルを用いて検討を行った。即ち、ラット下肢虚血モデルを用いて前記筋肉内投与を行った場合、下肢の虚血障害がどのように改善されるかを検討した。検討方法として、下肢の皮膚表面温度をサーモグラフィーを用いて測定し、皮膚表面温度の低下抑制を指標に筋肉内投与の効果を確認した。その結果、この筋肉内投与により虚血下肢における皮膚表面温度の低下が抑制されることを見出した。これは、HGFが持つ血管新生作用により、虚血下肢の血行動態が改善され温度の低下が抑制されたことを示している。

以上のように、ASOモデルに対するHGFの筋肉内投与の有効性が、初めて明らかとなった。

【0012】

さらに本発明者らは、ラット下肢虚血ASOモデル及びウサギ下肢虚血ASOモデルを用いて前記筋肉内投与を行い、I/N比（%）（虚血肢血圧／正常肢血圧×100）を調べた。その結果、比較的低投与量・低投与頻度（100μg/kg×2回）で、I/N比の有意な改善が認められた。これは、HGFが持つ血管新生作用により、虚血肢の血行動態が改善したことを示している。さらに、ウサギモデルについては血管造影も行ったところ、HGF投与群のほうが有意に血管造影スコアの増加率が高かった。これはすなわち、HGFの作用により側副血行路の発達が促進されたことを示している。また虚血肢関節の硬化度、虚血肢爪先の壊死・脱落および虚血肢下腿部の潰瘍の有無についても併せて調べたところ、HGFの筋肉内投与により改善する傾向が認められた。

【0013】

以上のように、虚血性疾患に対するHGFの筋肉内投与が極めて有効であることが明らかとなった。

上記の実験結果のうち、サーモグラフィーを用いて有効性が確認できたことは、臨床のASO患者、特に軽症の段階から自覚症状として虚血下肢の冷感を持つ患者に対してもHGFの筋肉内投与が有効であることを意味しており、加えてI/N比や血管造影の回復促進、さらには虚血肢の症状の軽減などの改善効果も確認できたことは、初期のASO患者から、重症なASO患者までこのHGFの筋肉内投与による治療が有効であることを示すものである。このことは、虚血による下肢の切断等が必要になる重症なASOに進行する前に、軽症の段階でASOの治療が出来ることを可能にするものであり、従って本発明の筋肉内投与用製剤は、現在有効な治療方法がまだない大勢の軽症のASO患者にとって、病状の進行を抑制、改善・回復できるという画期的な治療法を提供することができる。しかも、低投与量で効果を示すことから、静脈内投与と比較して副作用の少ない安全な医薬を提供することができる。

【0014】

なお、上記のようなHGFの効果をさらに発揮させるためには、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグリカン及びそれらを成分として含む蛋白キャリアーを含有しないHGF製剤が望ましいことも明らかとなった。即ち、コラーゲンを基質として作製したミニペレットからのHGFの放出に対するコンドロイチン硫酸配合の影響を検討したところ、コンドロイチン硫酸を配合したHGF含有ミニペレットでは、コンドロイチン硫酸を配合せずアラニンを配合したHGF含有ミニペレットと比較し、ミニペレットからのHGFの放出が速いという結果が得られた。このことは、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグリカンを配合しないHGF製剤の方が、HGFの放出が遅いことを示している。このことは上記のように、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグリカン含有しないHGF製剤の方が、投与局所の組織において保持され易く、血液を介する全身の他の臓器への移行、分布を抑えることができることを意味している。

【0015】

本発明は、以上のような知見に基づいてなされたものである。すなわち本発明は、

(1) HGFを有効成分とし、投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量の該因子を移行・分布・作用させ、且つ、投与部位以外の血液中及び全身の組織への移行・分布・作用を低減できる製剤、

(2) 虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するための、前記(1)記載の製剤、

(3) 投与部位が筋肉である、前記(1)又は(2)記載の筋肉内投与用製剤、

(4) 投与部位が皮下又は表皮である、前記(1)又は(2)記載の皮下投与用製剤、外用剤又はハップ剤、

(5) 投与部位が骨格筋又は心筋である、前記(3)記載の筋肉内投与用製剤、

(6) 投与部位である筋肉組織への移行・分布・作用が、血液、肝臓及び腎臓への移行・分布・作用を凌駕することを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)又は(5)記載の製剤、

(7) HGFを有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へボラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓における最大濃度が100分の1以下であり、投与部位である筋肉組織内濃度が50倍以上であることを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)、(5)又は(6)記載の筋肉内投与用製剤、

(8) HGFを有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へボラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓におけるAUCが5分の1以下であり、投与部位である筋肉組織内AUCが50倍以上であることを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)、(5)又は(6)記載の筋肉内投与用製剤、

(9) 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための、前記(1)、(2)、(3)、(5)、(6)、(7)又は(8)記載の筋肉内投与用製剤、

(10) 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための投与部位が患部及びその周辺の筋肉局所である、前記(9)記載の筋肉内投与

用製剤、

(11) 1回の投与量が $0.01 \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ であることを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)又は(10)記載の筋肉内投与用製剤、

(12) 1回の投与量が $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ であることを特徴とする、前記(11)記載の筋肉内投与用製剤、

(13) 動脈疾患が閉塞性動脈硬化症である、前記(1)～(12)いずれか記載の製剤、

(14) 虚血性疾患が虚血性心疾患である、前記(1)～(12)いずれか記載の製剤、並びに

(15) HGFを有効成分として含有し、且つ、HGFを結合・吸着する物質を含有しないことを特徴とする、前記(1)～(14)いずれか記載の製剤、に関する。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明で使用されるHGFは公知物質であり、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができ、また既に市販されている製品（例えば、東洋紡Code No. HGF-101等）を使用してもよい。HGFの製造法としては、例えば、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して該HGFを得ることができる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることができる（例えば Nature, 342, 440 (1989)、特開平5-111383号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989)など参照）。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母又は動物細胞などを用いることができる。このようにして得られたHGFは、天然型HGFと実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失

及び／又は付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失及び／又は付加されていてもよい。

【0017】

本発明のHGF含有製剤は、投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量の該因子を移行・分布・作用させ、且つ、投与部位以外の血液中及び全身の組織への移行・分布・作用を低減できることを特徴とする。

具体的な適用疾患としては、例えば虚血性疾患あるいは動脈疾患といった、現在までにHGFの薬効が確認されている全ての循環器系の疾患が挙げられる。すなわち心疾患としては、虚血性心疾患、心筋梗塞、急性心筋梗塞、心筋症、狭心症、不安定狭心症、冠動脈硬化、心不全などが挙げられ、四肢虚血性疾患としては、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、血管損傷、動脈塞栓症、動脈血栓症、臓器動脈閉塞、動脈瘤などが挙げられる。

【0018】

投与方法としては、前記の如く投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量のHGFを移行・分布・作用させ、且つ投与部位以外の血液中及び全身の組織への移行・分布・作用を低減できる投与方法であれば如何なる投与方法であっても良い。具体的には、筋肉（骨格筋、心筋）内投与、皮下もしくは表皮への投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、注射用水性剤もしくは油性剤、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、エアロゾル剤、ハップ剤などが挙げられる。さらに、徐放性のミニペレット製剤を調製し患部近くに埋め込むこと、あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することなども可能である。これらの製剤は、従来公知の技術を用いて調製され、有効成分であるHGFに対し、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、保存剤、あるいは可溶化剤等を添加しても良い。

【0019】

その際、本発明のHGF含有製剤は、HGFに結合・吸着する物質を含有しない製剤であることが好ましい。すなわち、本発明において初めて提示したコンドロイチン硫酸などの細胞外基質の構成成分を配合しないHGF製剤は、配合したものと比較して、投与部位からのHGFの放出が遅いという特徴を有する。従っ

て投与局所から血中、他の臓器への大量の移行を抑えることができる。さらに、コンドロイチン硫酸と同じく細胞外基質の構成成分であるヘパリンを配合することにより血中クリアランスの抑制されることが知られているが（Hepatology、20、417（1994））、本発明の製剤は細胞外基質の構成成分を含有しないものであるため、血中に移行したHGFのクリアランスを抑制しない。従って他の臓器への移行性、反応性をさらに抑制し、投与部位である筋肉における有効性を高めることができると考えられる。

【0020】

ここでHGFを吸着・結合する物質としては、例えば、細胞外基質（マトリックス）の構成成分である糖、糖蛋白、糖脂質、複合糖質などが挙げられる。より具体的には、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリン様物質などが挙げられる。硫酸基などを含む糖、糖蛋白、糖脂質、複合糖質など、HGFに結合・吸着する物質も同様である。また、生体構成成分に限定されず、上記、糖、糖蛋白、糖脂質、複合糖質の一部を含むことにより、HGFに吸着・結合する物質も同様である。さらに、HGFを吸着・結合する物質としては、蛋白製剤に使用される蛋白質、糖蛋白質などの蛋白キャリアーまたはそれらに含有されるHGFに結合・吸着する物質も含まれる。HGFを吸着・結合する物質として、蛋白キャリアーに微量に含有されるHGFに結合・吸着する物質もこの範疇に含まれる。以上のようなHGFに結合・吸着する物質を含有しないものが、本発明のHGF含有製剤として好ましい。

【0021】

また、蛋白製剤において、pHやイオン強度、イオン濃度などの条件、あるいは化学修飾などにより、タンパク質の重合の割合などの物性が異なることが知られている。この様なタンパク質の物性の違いも、筋肉などの投与した組織における本発明の投与用製剤の保持、血中への移行性に影響すると考えられる。

【0022】

後述の実施例5及び6に示したように、本発明の投与用製剤は、投与量、投与回数の少ないことをも特徴とする。投与量としては、患者の症状、年齢、性別等によって異なるが、例えば成人患者の患部またはその周辺に筋肉内投与する場合

、 $0.01 \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{回}$ 、好ましくは $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{回}$ 程度の投与量が挙げられる。また投与期間・投与頻度としては、長くとも3ヶ月以内の投与期間で週1～2回の投与頻度が挙げられ、好ましくは1週間以内の投与期間で週7回以下の投与頻度が挙げられる。さらに好ましくは、1週間以内の投与期間で1～2回の投与頻度が挙げられる。

【0023】

本発明の投与用製剤を適用する患者における投与部位の特定及び投与方法としては、以下のものが挙げられる。例えば、閉塞性動脈硬化症の虚血肢の診断においては、安静時疼痛、間歇性跛行、潰瘍の有無、トレッドミルを用いた歩行可能な距離の測定、ドップラー血流計等を用いたAnkle Pressure Index（下肢血圧と上腕血圧の比）の測定を行い、虚血肢、虚血領域を推定する。造影剤を用いた血管造影（Angiography）、Digital Subtraction Angiography, Magnetic Resonance Angiographyなどにより、血管の狭窄、閉塞部位を詳しく特定する。肢の状態の判定に関しては、例えば、Society for Vascular Surgery/ North American Chapter and International Society for Cardiovascular Surgery により推奨された標準書などに従う。血管造影などにより特定された虚血部位の筋肉及びその周辺の筋肉に対し、本発明の投与製剤を、その領域の大きさに応じて1ヶ所から20ヶ所、好ましくは3ヶ所から6ヶ所に分けて投与する。

さらに本発明の筋肉内投与用製剤は、前記治療目的の他、予防のためにも使用することができる。

【0024】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0025】

実施例1

投与経路によるHGFの体内動態の比較

1. 筋肉内投与によるHGFの体内動態の検討

(1)方法

フィッシャー系ラット用いて、HGFを0.3、1、3 mg/kgで筋肉内投与した場合と、6、60、600 μ g/kg/hrで3時間静脈内持続投与した場合の血清、肝臓、腎臓、筋肉（投与部および対側）中HGF濃度を測定した。筋肉内投与は、エーテル麻酔下で、ラットの左大腿後部筋肉の中央部に行った。投与容量は1 ml/kgとし、0.3M NaCl, 0.03% Tween 80, 5 mg/ml L-alanineを含む10 mMクエン酸緩衝液（pH 5.5）をvehicleとして用いた。HGF投与から5分、30分、2時間、8時間、24時間経過後、ラットから血清、肝左側葉、腎臓、筋肉（投与部および対側）を得た。静脈内持続投与はラットの尾静脈から行い、投与速度は0.07 ml/hrとした。投与開始から3時間以上経過後に、同様に血清、肝左側葉、腎臓、筋肉を得た。血清中および各臓器中のヒトHGF濃度については、ヒトHGF測定用ELISAキットであるイムニスHGF EIA（特殊免疫研究所製）を用いて測定した。臓器中のHGFは、2M NaCl、1mM PMSF、1mM EDTA、0.1% Tween 80を含有する20 mM Tris-HCl（pH 7.5）を抽出液として用い（筋肉：12 ml/g tissue、肝臓・腎臓：8 ml/g tissue）、1分間ホモジナイズした後、4℃、15,000 rpmで60分間遠心分離し、抽出液中のHGF量を上述のELISAキットにて測定した。その際、スタンダード溶液についても、HGFを投与していないラットの臓器に既知濃度のHGFを添加し、同様に抽出した溶液を用いた。また、サンプルの希釈液についても、HGFを投与していないラットの臓器の抽出液を同様に調製して用いた。濃度推移の解析にはモーメント解析法を用いた。

【0026】

(2)結果

HGFを大腿部筋肉内に投与した後の筋肉におけるHGF濃度の推移について、図1に示す。HGFを尾静脈内へ持続投与した後の結果についても、併せて図1に示す。HGFを尾静脈から6、60 μ g/kg/hrで3時間持続投与したときの筋肉中濃度については測定限界（1.5 ng/g tissue）以下であった。3 mg/kgで筋肉内投与した場合の筋肉中における薬物動態パラメー

タを表1に示した。投与部筋肉内におけるHGFの $t_{1/2}$ は10.6時間であり、投与24時間後においてもピーク時の約18%の濃度が維持されていた。HGFを尾静脈よりボラス投与した場合も、例えば0.3mg/kgのHGFの投与により筋肉内に検出されるHGF濃度は、10ng/g tissueのオーダーである。

【0027】

【表1】

投与経路、投与量	筋肉内投与、3mg/kg	
	投与部	対側
AUC(hr·ng/g tissue) (infinite)	11.6 x 10 ⁵	820
t _{1/2} (hr)	10.6	11.2
C _{max} (ng/g tissue)	84.1 x 10 ³	82.4
T _{max}	5min	5min

【0028】

以上の図1および表1に示されるように、HGFを筋肉内投与した場合、投与した筋肉内で非常に高い濃度を示した。これらは、HGFが薬効を示すために十分すぎる濃度であると考えられた。一方、対側の筋肉内においては、投与部の約1/1000の濃度に留まった。図2に示されるように、HGFを筋肉内に投与した場合、血清中のHGF濃度は比較的強く推移し、投与部筋肉内から循環血中への移行率は6.7%と低かった。また、図3、4に示されるように、HGFを筋肉内投与した場合、肝臓、腎臓中のHGF濃度は静脈内投与した場合と比較して、極端に低かった。HGFを静脈内へ持続投与した後の血清中、肝臓、腎臓のHGF濃度の結果についても、併せて図2、3、4に示す。

【0029】

HGFを静脈内に持続投与した場合、血清、肝臓、腎臓中のHGF濃度が高く持続されるのに対し、筋肉内におけるHGF濃度は極端に低かった。最高投与量である600μg/kg/hr群を例にとると、血清中では536ng/mlのHGFが存在していたのに対し、筋肉中では10ng/g tissue未満しか存在しなかった。このことから、虚血筋肉患部及びその周辺の筋肉又はそこに存在する血管に選択的にHGFを作用させる事を目的とした場合、静脈内投与で

は効率が悪く、局所筋肉内に直接投与する方が有効であると考えられた。また、HGFを筋肉内に投与する事により、肝臓、腎臓などの他の臓器には作用させずに、筋肉組織に選択的にHGFを作用させる事ができ得ると考えられた。

【0030】

2. 投与経路によるHGF血中濃度推移の比較

(1) 方法

フィッシャー系ラット用いて、HGFを 3 mg/kg で筋肉内投与した場合と、 0.3 mg/kg で静脈内bolus投与した場合と、 3 mg/kg で皮下投与した場合の血清中HGF濃度を測定した。筋肉内投与は、エーテル麻酔下で、ラットの左大腿後部筋肉の中央部に行った。投与容量は 1 ml/kg とし、 0.3 M NaCl , 0.03% Tween 80, 5 mg/ml L-alanineを含む 10 mM クエン酸緩衝液(pH 5.5)をvehicleとして用いた。筋肉内投与では、HGFの投与から5分、30分、2時間、8時間、24時間経過後にラットから血清を採取した。静脈内投与はラットの尾静脈から行い、投与から2分、5分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、12時間、24時間経過後に血清を採取した。また、皮下投与では、投与後5分、15分、30分、1時間、2時間、5時間、12時間、24時間に血清を得た。ラット血清中のヒトHGF濃度については、ヒトHGF測定用ELISAキットであるイムニスHGF EIA(特殊免疫研究所製)を用いて測定した。濃度推移の解析にはモーメント解析法を用いた。

【0031】

(2) 結果

測定結果を解析して得られた薬物動態パラメータを表2に示す。ただし、静脈内bolus投与については、投与量に対する線形性を仮定し、 3 mg/kg のHGF投与時のパラメータを算出した。血清中におけるAUCは、静脈内bolus投与に比べて、筋肉内投与、皮下投与で低く、それぞれ静脈内bolus投与のAUCの6.7%、2.6%であった。また、最高血清中濃度(C_{max})についても、静脈内bolus投与に比べて、筋肉内投与、皮下投与で低く、それぞれ静脈内bolus投与の C_0 の0.012%、0.0087%であった。

【0032】

【表 2】

投与経路	筋肉内	静脈内 bolus	皮下
投与量	3mg/kg	3mg/kg	3mg/kg
AUC (min·ng/ml (infinite))	6310	94390	2419
t _{1/2} (min)	801	8.8	525
C _{max} or C ₀ (ng/ml)	8.96	73380 (C ₀)	6.42
T _{max}	5min	—	5min
AUC ratio (% i.v.)	6.7%	—	2.6%
C _{max} ratio (% i.v. C ₀)	0.012%	—	0.0087%

【0033】

3. 投与経路による HGF 筋肉内濃度推移の比較

(1) 方法

SD系ラット用いて、HGFを0.01mg/kgで筋肉内投与した場合と、30mg/kgで静脈内bolus投与した場合の筋肉中HGF濃度を測定した。筋肉内投与は、エーテル麻酔下で、ラットの左大腿後部筋肉の中央部に行った。投与容量は0.5ml/kgとし、0.3M NaCl, 0.03% Tween 80, 5mg/ml L-alanineを含む10mMクエン酸緩衝液 (pH 5.5) をvehicleとして用いた。HGF投与から30分、6時間、24時間経過後、ラットから筋肉(投与部)を得た。静脈内bolus投与はラットの尾静脈から1ml/kgにて行い、投与から5分、30分、1時間、24時間経過後、同様に筋肉を採取した。筋肉中のヒトHGF濃度については、ヒトHGF測定用ELISAキットであるイムニスHGF EIA(特殊免疫研究所製)を用いて測定した。臓器中のHGFは、2M NaCl、1mM PMSF、1mM EDTA、0.1% Tween 80を含有する20mM Tris

-HCl (pH 7.5) を抽出液として用い (12ml/g tissue)、1分間ホモジナイズした後、4℃、15,000rpmで60分間遠心分離し、抽出液中のHGF量を上述のELISAキットにて測定した。その際、スタンダード溶液についても、HGFを投与していないラットの筋肉に既知濃度のHGFを添加し、同様に抽出した溶液を用いた。また、サンプルの希釈液についても、HGFを投与していないラットの筋肉の抽出液を同様に調製して用いた。濃度推移の解析にはモーメント解析法を用いた。

【0034】

(2)結果

筋肉内ヒトHGF濃度を測定した結果から得られた薬物動態パラメータについて、表3に示す。但し、比較のため、静脈内bolus投与については、投与量に対する線形性を仮定し、0.01mg/kgのHGF投与時のパラメータを算出した。同量のHGF投与を仮定した場合、筋肉中におけるAUCは静脈内bolus投与に比べて、筋肉内投与（投与部）で著しく高く、静脈内bolus投与の約650倍であった。また、最高筋肉中濃度（Cmax）についても、静脈内bolus投与に比べて、筋肉内投与（投与部）で著しく高く、静脈内bolus投与の約960倍であった。

【0035】

【表3】

	筋肉内 (im)	静脈内 bolus (iv)	im / iv
AUC (ng·hr/g muscle)	4160	6.37	650
Cmax (ng/g muscle)	459	0.476	960

【0036】

実施例2

ラット下肢虚血ASOモデルに対する筋肉内投与の薬効検討

(1)方法

SD系ラット（9週齢、雄）を用いた。約50mg/kgのペントバルビタール（ダイナボット社製、ネンブタール）を腹腔内投与し、ラットを麻酔した。分

枝を結紮した後、左大腿動脈を摘出し、ラット下肢虚血モデルを作成した。ラットをエーテルにより麻酔し、左大腿部内側の筋肉内にHGFまたはvehicleを投与した。大腿動脈摘出直後から投与を開始し、投与量 1mg/kg/day 、投与容量 1ml/kg/day 、1日1回、5日間投与した。vehicleとして 0.3M NaCl 、 0.03% Tween80、 5mg/ml alanine、 $10\text{mM Na-citrate buffer (pH 5.5)}$ を用いた。大腿動脈摘出から14日後に、ペントバルビタールによりラットを麻酔し、下肢周辺の毛を除毛クリームにて除毛した後、サーモグラフィー（日本アビオニクス社製）を用いて、大腿下部内側（図5の部位1）・下腿部内側（同部位2）・膝下外側（同部位3）・下腿前部外側（同部位4）・大腿下部外側（同部位5）・下腿部外側（同部位6）の6ヶ所の皮膚表面温度を、両下肢同時に測定した。それぞれの測定部位について、虚血肢温度から正常肢温度を引き、皮膚表面温度の差を算出した。

【0037】

(2)結果

虚血肢と正常肢の皮膚表面温度の差を図5に示す。即ち、大腿動脈を摘出し、vehicleを投与した群（図中、白）では、虚血肢の各部位において、正常肢と比べて $0.8\sim 1.7^{\circ}\text{C}$ の温度低下が見られた。それに対して、HGFを投与した群（図中、黒）においては、 $0.2\sim 1.0^{\circ}\text{C}$ の温度低下に抑えられていた。各部位毎に、温度低下を2群間で比較したところ、6ヶ所全ての部位において、HGF投与群の方が温度低下が小さい傾向が見られた。また、下腿部内側および大腿下部外側の2ヶ所においては、HGFの投与により有意に温度低下が抑制された。

【0038】

以上の図5から示されるように、ラット下肢虚血モデルを作製し、虚血肢の大腿部筋肉内にHGFを投与したところ、虚血肢における皮膚表面温度の低下が抑制された。これは、HGFが持つ血管新生作用により、虚血肢における血行動態が改善され、温度の低下が抑制されたと考えられる。

【0039】

実施例 3

HGF 含有ミニペレットからの *in vitro* HGF 放出におけるコンドロイチン硫酸の影響

(1) アラニン 10% 含有の HGF 含有ミニペレットの調製法

HGF 含有量: 131.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ミニペレット

HGF 65.3 mg を含有する水溶液 6.9 ml と 1% アラニン水溶液 4.4 ml と蒸留水 16 ml および 2% アテロコラーゲン 16.7 g を混合し、凍結乾燥した後、少量の蒸留水を加えて膨潤させ、練合し、均質な混合液にした。これを 10 ml のディスポーザブルシリンジに入れ、10,000 G で 60 分間遠心脱泡した。これをシリンジから押し出した後、乾燥し、切断することにより一本あたり 500 μg の HGF を含有する棒状のミニペレット (直径 1.1 mm, 長さ 4 mm) を得た。

【0040】

(2) コンドロイチン硫酸 10% 含有の HGF 含有ミニペレットの調製法

HGF 含有量: 132.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ミニペレット

HGF 65.3 mg を含有する水溶液 6.9 ml と 1.5% コンドロイチン硫酸ナトリウム水溶液 2.9 ml と蒸留水 17 ml および 2% アテロコラーゲン 16.7 g を混合し、凍結乾燥した後、少量の蒸留水を加えて膨潤させ、練合し、均質な混合液にした。これを 10 ml のディスポーザブルシリンジに入れ、10,000 G で 60 分間遠心脱泡した。これをシリンジから押し出した後、乾燥し、切断することにより一本あたり 500 μg の HGF を含有する棒状のミニペレット (直径 0.9 mm, 長さ 4 mm) を得た。

【0041】

(3) *in vitro* 放出試験

0.3% Tween 20 を含む PBS (pH 7.4) を放出液として用いた。37℃において、2 ml の放出液中に上述の方法で調製したミニペレットを各々入れ、HGF の放出速度を測定した ($n=2$)。放出液中の HGF 濃度については、ヘパリンアフィニティークロマトグラフ法にて測定した。

【0042】

実験結果を図6に示す。即ち、コンドロイチン硫酸含有のミニペレットからは、1日後にはほぼ100%のHGFが放出されたのに対し、コンドロイチン硫酸を含有しないアラニン含有ミニペレットからは緩やかにHGFが放出された。放出開始から7日後においても放出されたHGF量はミニペレット含有量の30%未満に留まった。これは、HGFと親和性を持つコンドロイチン硫酸などのプロテオグリカンとHGFを共存させる事により、HGFの放出を促進させ得る事を示す。また逆に、コンドロイチン硫酸などのプロテオグリカンを共存させない事により、放出を緩やかにし、投与部位に局所的にHGFを作用させ得る可能性を示す。

【0043】

実施例4

ラット筋肉内HGF投与後の各臓器におけるc-Metのリン酸化

(1)方法

SD系ラット(12週齢、雄)を用いて、筋肉内投与後の筋肉、肝臓、腎臓におけるc-Metのリン酸化について検討した。エーテル麻酔下でラットの左大腿後部筋肉内に3、0.3、0.03mg/kgのHGFを投与した。投与から5分、30分後にラットを脱血し、筋肉、肝臓、腎臓を摘出した。摘出した臓器にRIPA buffer(50mM Tris-HCl(pH7.4), 50mM NaCl, 1% TritonX-100, 5mM EDTA, 10mM Na₄P₂O₇, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 0.4mM AEB SF, 10μg/ml Leupeptin, 10μg/ml Aprotinin, 1μg/ml PepstatinA)を5(筋肉)または8(肝臓、腎臓)ml/g tissue添加し、ポリトロンを用いてホモジネートした。そして、16000rpm、4℃、30分間遠心分離することにより沈殿を除いた。10mg(筋肉)または5mg(肝臓、腎臓)の蛋白を含む抽出液をRIPA bufferで1mlとし、50μl(約50%)のProtein G Sepharose(Pharmacia社)を加え、4℃で、2時間攪拌した。遠心により、Protein G Sepharoseを除き、その上清に1μgの抗c-Met抗体(Santa Cruz社)を加え、4℃で一晩攪拌した。さ

らに、20 μ lのProtein G Sepharoseを加え、4℃で2時間攪拌した。遠心により上清を除き、Protein G Sepharoseを1mlのRIPA bufferで3回洗浄した後、2×loading bufferを加え、100℃、5分間加熱し、7.5% SDS-PAGEに供した。泳動した蛋白はニトロセルロースフィルター上に電氣的に転写、結合させた。フィルターは、3% BSAを含むTBS-T (10mM Tris-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 0.05% Tween 20) 中で振とうすることにより、ブロッキングした。TBS-Tで軽く洗浄後、1 μ g/mlの抗リン酸化チロシン抗体 (Upstate Biotechnology社) を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。さらにTBS-Tで洗浄後、2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIg抗体 (Amersham社) を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。TBS-Tで洗浄後、ECLウエスタンブロット検出試薬 (Amersham社) を用いて、リン酸化されたc-Metの検出を行った。

【0044】

フィルターは、62.5mM Tris-HCl (pH 6.7), 100mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS溶液中で、60℃、30分間振とうすることにより、デブローブし、TBS-Tで洗浄後、3% BSAを含むTBS-T中で振とうすることにより、ブロッキングした。TBS-Tで軽く洗浄後、0.5 μ g/mlの抗c-Met抗体を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。さらにTBS-Tで洗浄後、2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIg抗体 (Amersham社) を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。TBS-Tで洗浄後、ECLウエスタンブロット検出試薬を用いて、c-Metの検出を行った。

【0045】

(2)結果

リン酸化c-Metに対するIP-Westernの結果を図7に示す。筋肉組織では、0.03~3mg/kgの各投与量において、c-Metの著しいリン酸化が見られた。一方、肝臓および腎臓においては、HGF筋肉内投与による

c-Metのリン酸化は見られなかった。この事は、3mg/kg以下のHGFを筋肉内に投与する事により、肝臓・腎臓に作用させる事無く、筋肉組織・筋肉組織中の血管に選択的にHGFを作用させ得る事を示している。

【0046】

実施例5

ラット下肢虚血ASOモデルに対する筋肉内投与の薬効検討

(1)方法

SD系ラット（14週齢、雄）を用いた。約50mg/kgのペントバルビタール（ダイナボット社製、ネンブタール）を腹腔内投与し、ラットを麻酔した。分枝を結紮した後、左大腿動脈を摘出し、ラット下肢虚血モデルを作成した。その直後に、左大腿部の筋肉内にHGFまたはvehicleを投与した。投与量は100μg/kg、投与容量は1ml/kgとした。さらに4日後、エーテル麻酔下で同様に投与を行った。vehicleとして0.3M NaCl, 0.03% Tween80, 5mg/ml alanine, 10mM Na-citrate buffer (pH5.5)を用いた。大腿動脈摘出から14日後に、ペントバルビタールによりラットを麻酔し、実験動物用非観血式血圧計を用いて下肢血圧を測定した。正常肢、虚血肢それぞれの血圧からI/N比(%) = 虚血肢血圧/正常肢血圧×100を計算し、評価を行った。

【0047】

(2)結果

結果を図8に示す。HGF投与群では、vehicle投与群に比べ有意にI/N比が改善された。これは、HGFが持つ血管新生作用によるものと考えられた。

【0048】

実施例6

ウサギ下肢虚血ASOモデルに対する筋肉内投与の薬効検討

(1)方法

NZW系ウサギ（22週齢、雄）を用いた。5mg/kgのキシラジン（バイエル株式会社製、セラクター）および50mg/kgのケタミン（三共株式会

社製、ケタラル)を上腕部筋肉内に投与し、ウサギを麻酔した。左大腿部を切開し、左大腿動脈を摘出することにより、ウサギ下肢虚血モデルを作成した。その10日後および15日後に、同様に麻酔を行い、左大腿部の筋肉内にHGFまたはvehicleを投与した。投与量は $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、投与容量は $1\text{ml}/\text{kg}$ とした。vehicleとして0.3M NaCl, 0.03% Tween 80, $5\text{mg}/\text{ml}$ alanine, 10mM Na-citrate buffer (pH 5.5)を用いた。大腿動脈摘出から10日後(薬液投与前)、22日後、および42日後に、上記方法によりウサギを麻酔し、ドップラー血流計(Triton社製)と水銀血圧計を用いて両下肢の血圧を測定した。正常肢、虚血肢それぞれの血圧から I/N 比(%) = 虚血肢血圧/正常肢血圧 $\times 100$ を計算し、評価を行った。10日後からの I/N 比の増加率についても算出し、評価した。また、動脈摘出から10日後および最終日(41または42日後)に、造影剤(山之内製薬株式会社製、オプチレイ350)を用いて左下肢選択的に血管造影を行った。得られた血管造影写真に、直径2.5mmの円を並べたシートを重ね、血管と重なっている円の数のカウントし、円の全数(800個)に対する割合を算出し、血管造影スコアとした。各ウサギの血管摘出10日後の血管造影スコアから最終日の血管造影スコアへの増加率(%)を計算し、血管造影スコア増加率として評価した。最終日に、虚血肢関節の硬化度、虚血肢爪先の壊死・脱落、虚血肢下腿部の潰瘍について観察した。

【0049】

(2)結果

下肢血圧の I/N 比の推移を図9に示す。動脈摘出22日後から、HGF投与群で高値の傾向を示し、42日後において、HGF投与群では、vehicle投与群に比べ有意に I/N 比が改善された。これは、HGFが持つ血管新生作用により、虚血肢の血行動態が改善したものと考えられた。また、下肢血圧の I/N 比の増加率を図10に示す。動脈摘出10日後から42日後までの I/N 比の増加率は、vehicle群と比較してHGF投与群で有意に高かった。血管造影スコアの増加率を図11に示す。vehicle投与群に比べて、HGF投与群の方が有意に増加率が高く、HGFの作用により側副血行路の発達が促進され

たものと考えられた。評価最終日の虚血肢の観察においても、HGF投与群の方が、vehicle投与群と比較して症状が軽い傾向が認められ（表4）、HGF投与による虚血肢の血行動態の改善を反映していると思われた。

【0050】

【表4】

群	下肢関節の硬化			爪先の壊死・脱落	虚血肢の潰瘍
	なし	軽度	重度		
vehicle(n=8)	4	1	3	1	3
HGF(n=8)	6	2	0	0	0

【0051】

製剤例1

生理食塩水100ml中にHGF1mg、マンニトール1g及びポリソルベート80 10mgを含む溶液を無菌的に調製し、1mlずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

【0052】

製剤例2

0.02Mリン酸緩衝液（0.15M NaCl及び0.01%ポリソルベート80含有、pH7.4）100ml中にHGF1mg及びヒト血清アルブミン100mgを含む水溶液を無菌的に調製し、1mlずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

【0053】

【発明の効果】

本発明により、HGFを有効成分として含有し、虚血性疾患あるいは動脈疾患を治療又は予防するための投与用製剤が提供される。本発明の筋肉内投与用製剤は、静脈内投与と比較して半減期が長く、筋肉内に維持されやすいことから、従来の静注等の投与量が低減でき、副作用が軽減されるという効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ラット大腿後部筋肉内にHGFを投与した後の筋肉中濃度推移を示す

図である。

【図 2】

図 2 は、ラット大腿部筋肉内に HGF を投与した後の血清中の濃度推移を示す図である。

【図 3】

図 3 は、ラット大腿部筋肉内に HGF を投与した後の肝臓中の濃度推移を示す図である。

【図 4】

図 4 は、ラット大腿部筋肉内に HGF を投与した後の腎臓中の濃度推移を示す図である。

【図 5】

図 5 は、ラット下肢虚血モデルの皮膚表面温度に対する HGF の改善効果を示すグラフである。

【図 6】

図 6 は、HGF 含有コラーゲンミニペレットからの HGF の放出を示す図である。

【図 7】

図 7 は、ラット大腿部筋肉内に HGF を投与した後の筋肉、肝臓、腎臓における c-Met のリン酸化を示す図である。

【図 8】

図 8 は、ラット下肢虚血 ASO モデルに対して HGF を筋肉内投与し、I/N 比 (%) (虚血肢血圧 / 正常肢血圧 $\times 100$) を調べた結果を示す図である。

【図 9】

図 9 は、ウサギ下肢虚血 ASO モデルに対して HGF を筋肉内投与し、下肢血圧の I/N 比の推移を調べた結果を示す図である。

【図 10】

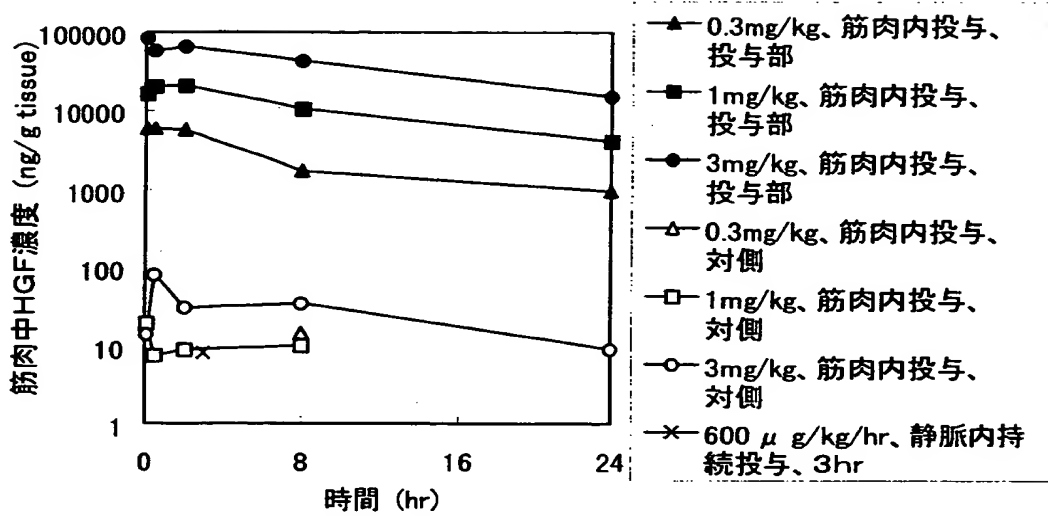
図 10 は、ウサギ下肢虚血 ASO モデルに対して HGF を筋肉内投与し、下肢血圧の I/N 比の増加率を調べた結果を示す図である。

【図 11】

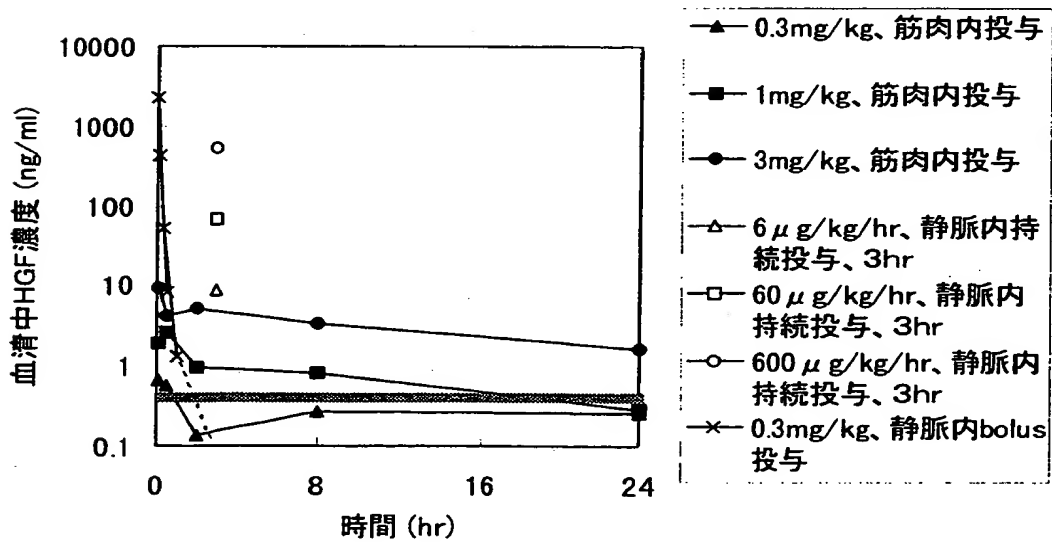
図 11 は、ウサギ下肢虚血 A S O モデルに対して H G F を筋肉内投与し、血管造影スコアの増加率を調べた結果を示す図である。

【書類名】 図面

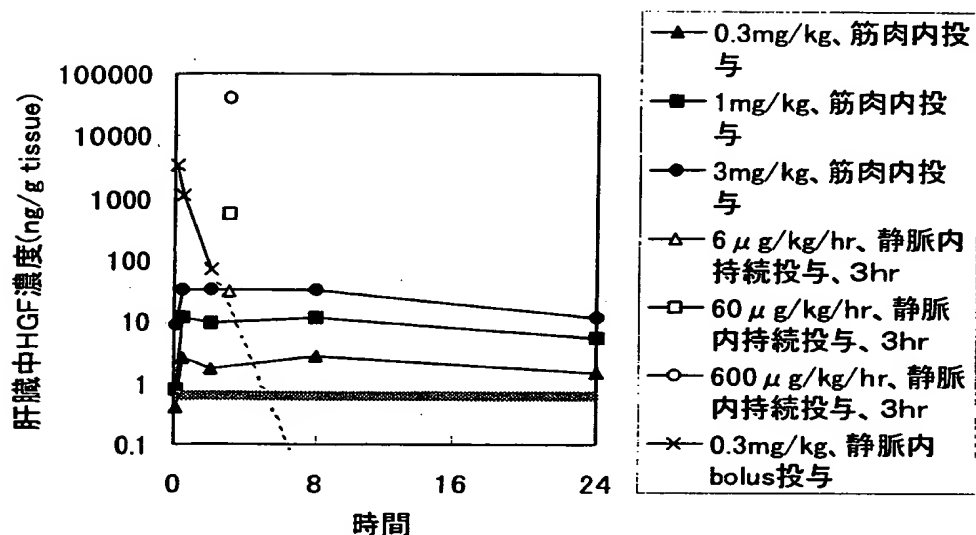
【図1】



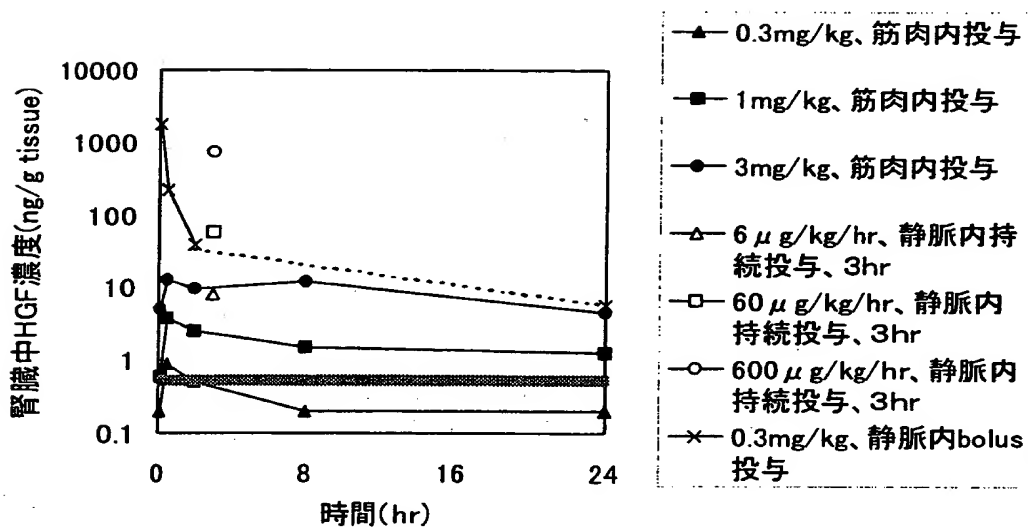
【図2】



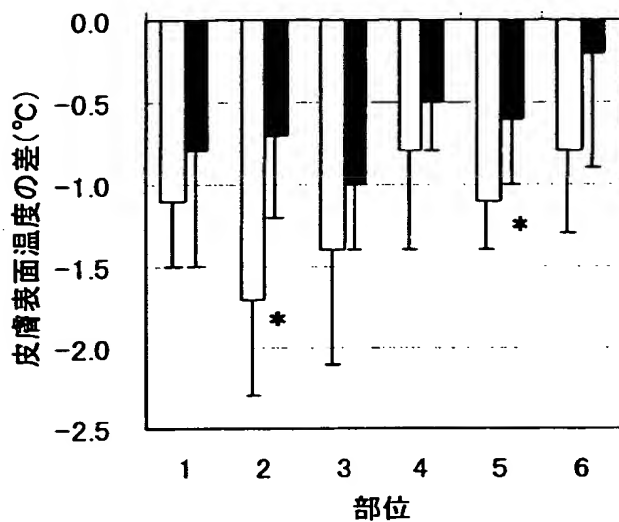
【図3】



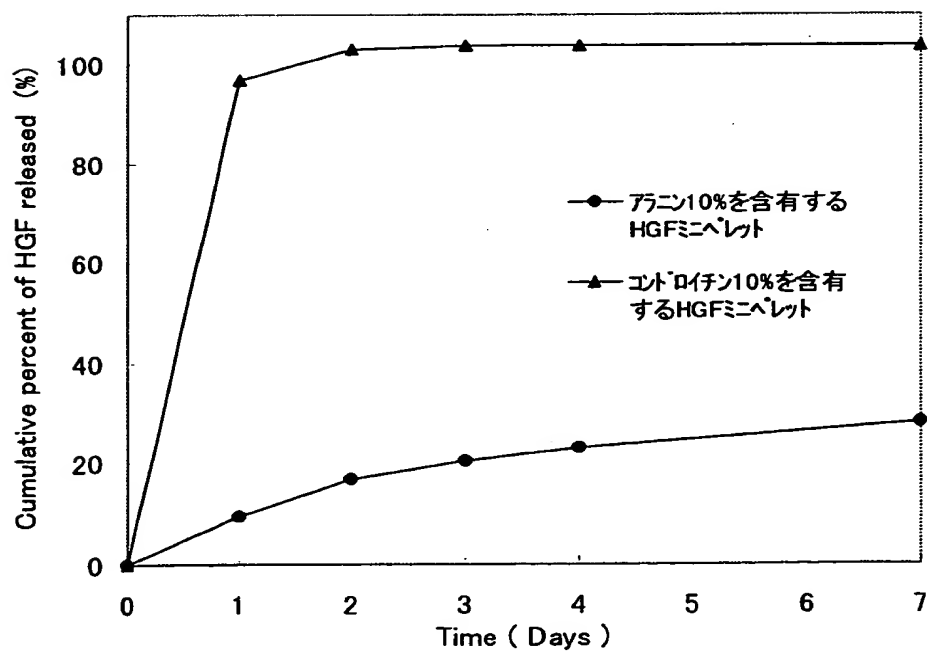
【図4】



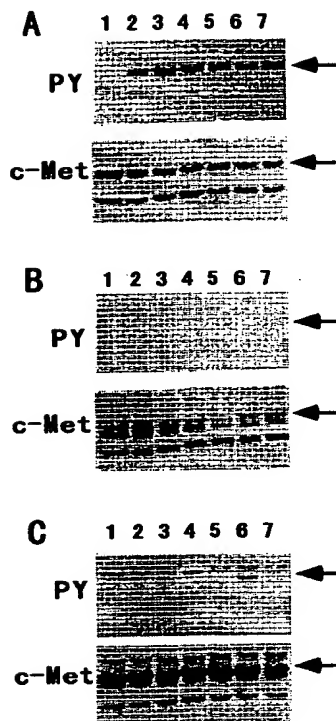
【図 5】



【図 6】



【図 7】

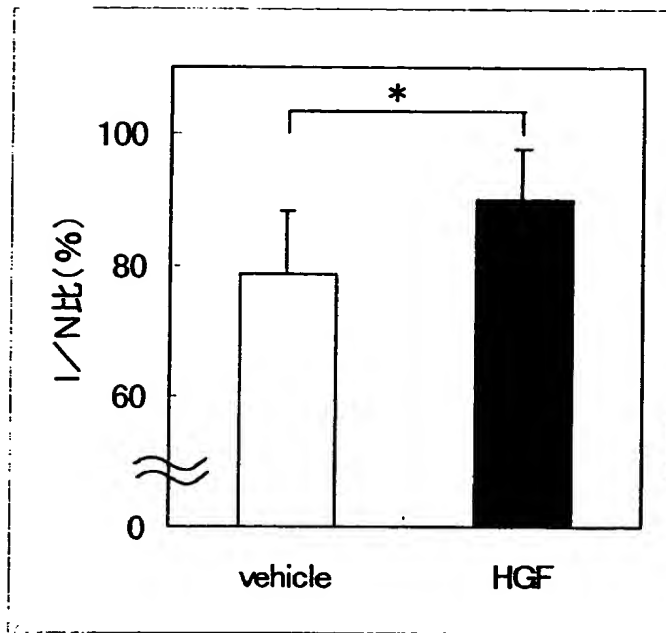


A: 筋肉、B: 腎臓、C: 肝臓

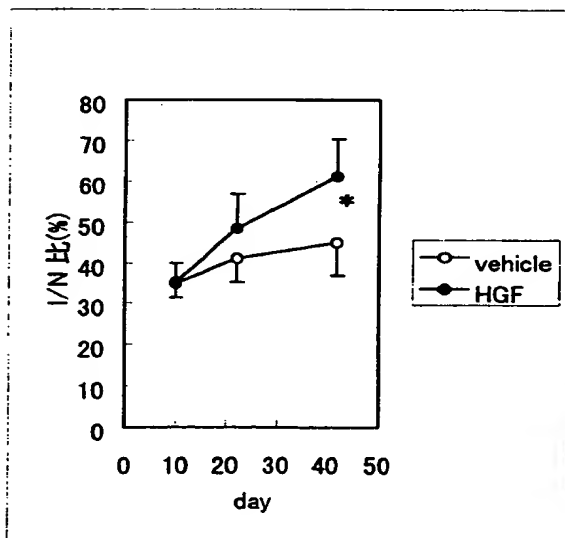
1: 無処置、2: 0.03mg/kg HGF投与5分後、3: 0.03mg/kg HGF投与30分後
 4: 0.3mg/kg HGF投与5分後、5: 0.3mg/kg HGF投与30分後
 6: 3mg/kg HGF投与5分後、7: 3mg/kg HGF投与30分後

PY: 抗リン酸化Tyr抗体によるblotting
 c-Met: 抗c-Met抗体によるblotting
 矢印は、c-Metの位置を示す。

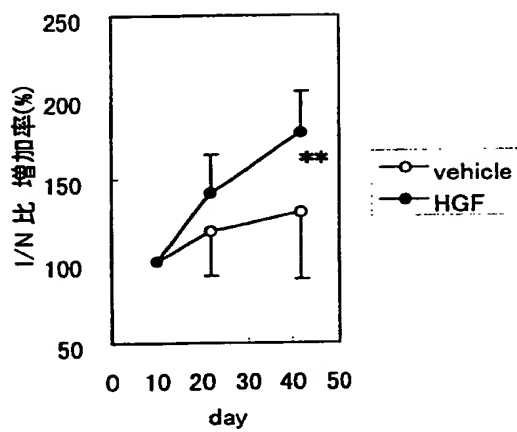
【図 8】



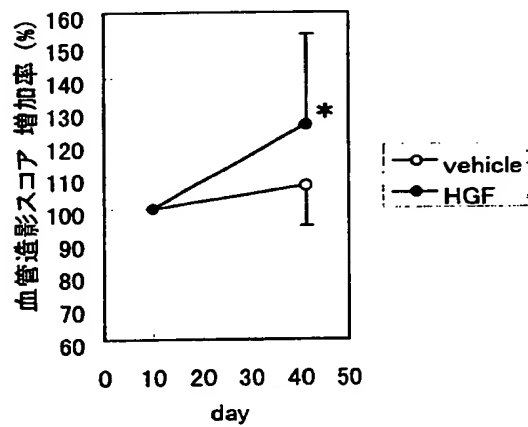
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有し、虚血性疾患あるいは動脈疾患を治療又は予防するための投与用製剤。

【効果】 静脈内投与と比較してHGFが投与された患部のHGF濃度が維持され半減期が長く、投与量が低減でき、副作用が軽減されるという効果を有する。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第006261号
受付番号	59900025720
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成11年 1月25日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 1月13日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000183370]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名

住友製薬株式会社